

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-322799

(43)Date of publication of application : 24.11.1999

(51)Int.Cl.

C07K 17/00
C07K 16/26
G01N 33/547

(21)Application number : 10-129944

(71)Applicant : TOSOH CORP

(22)Date of filing : 13.05.1998

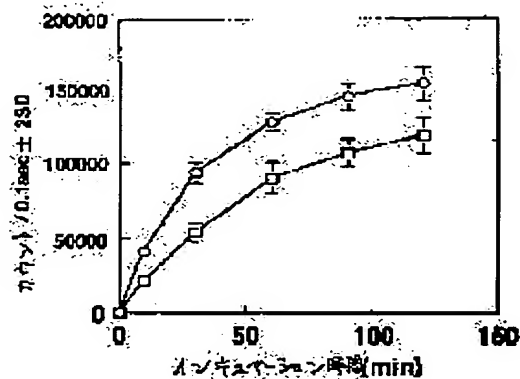
(72)Inventor : ONAKA SATORU
MITOMA YOSHITAMI
ISHIGURO NORIHIKO

(54) IMMOBILIZATION OF ANTIBODY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To immobilize an antibody, as its antigen-trapping ability is maintained, by specifically and chemically bonding the sites other than the antigen-recognizing ones in the antibody to the support and use the immobilized antibody in the measurement in the fields of the diagnosis such as immunoassay.

SOLUTION: The sites other than antigen-recognizing ones in the antibody are specifically and chemically bonded to the support such as plastic, glass thereby immobilizing the antibody. In a preferred embodiment, the antibody is bonded to the support via the SH group in the hinge region of the antibody or via the functional group introduced into the antibody to the antibody or through a linker between the antibody and the support to the antibody.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-322799

(43) 公開日 平成11年(1999)11月24日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 0 7 K 17/00

C 0 7 K 17/00

16/26

16/26

G 0 1 N 33/547

G 0 1 N 33/547

審査請求 未請求 請求項の数8 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平10-129944

(22) 出願日 平成10年(1998) 5月13日

(71) 出願人 000003300

東ソー株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72) 発明者 大仲 悟

東京都町田市本町田2524-1-19-103

(72) 発明者 三苫 恵民

神奈川県藤沢市湘南台4-26-5 サンパレス湘南106号

(72) 発明者 石黒 敬彦

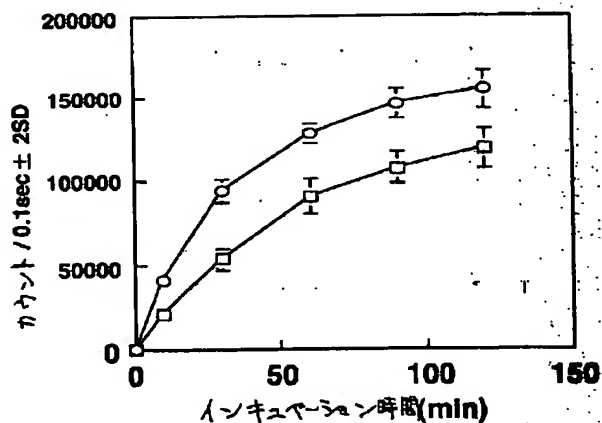
神奈川県横浜市港北区岸根町490-17

(54) 【発明の名称】 抗体の固定化方法

(57) 【要約】

【課題】 抗体の抗原捕捉能力を維持したまま固定化する方法を提供する。

【解決手段】 抗体の抗原認識部位以外の部位、例えばヒンジ部のSH基をリンカー、ビオチン及びアビジンを介して担体に固定化させ、イムノアッセイ用抗体を得る。



【特許請求の範囲】

【請求項1】抗体の抗原認識部位以外の部位を、特異的にかつ化学的に担体に結合させることを特徴とする、抗体の固定化方法。

【請求項2】請求項1に記載の方法において、抗体のヒンジ部のSH基を介して抗体を担体に結合させることを特徴とする方法。

【請求項3】請求項1に記載の方法において、抗体の糖鎖を介して抗体を担体に結合させることを特徴とする方法。

【請求項4】請求項1に記載の方法において、抗体に導入された官能基を介して抗体を担体に結合させることを特徴とする方法。

【請求項5】請求項1～4いずれかに記載の方法において、抗体と担体との間にリンカーを介在させることを特徴とする方法。

【請求項6】請求項5に記載の方法において、リンカーと担体との間にリガンド及びレセプターを介在させることを特徴とする方法。

【請求項7】請求項5に記載の方法において、リンカーと担体との間に高分子物質を介在させることを特徴とする方法。

【請求項8】請求項1～7いずれかに記載の方法において、抗体がイムノアッセイ用抗体であることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗体の固定化方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】抗原捕捉免疫化学的検査（エンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ）における抗体のプラスチック、ガラス、架橋デキストラン等、不溶性担体への固定化方法には、担体との疎水性相互作用により、直接担体に固定化させる方法、リンカー等を介して間接的に固定化する方法がある（エンザイムイムノアッセイ、石川栄治監訳、東京化学同人版、第1版、1989年、特開平2-107966号公報、特開昭55-10590号公報）。いずれの方法を用いる場合も、固定化された抗体は抗原を捕捉する能力を維持していなければならないが、従来の抗体固定化方法では、抗体のどの部分で固定化されているかを規定していないので、固定化された抗体が抗原捕捉能力を維持しているか否かについて考慮されていなかった。

【0003】例えば、担体に抗体の抗原認識部位が直接吸着・結合した場合、この抗体は抗原を捕捉することができない。また抗体と担体とを架橋して間接的に固定化する場合に、サクシイミド基などを用いて抗体のアミノ基やリジン残基にリンカーを導入すると、アミノ基やリジン残基は抗体の各部に存在するため抗体のどの部分に

リンカーが導入されたか規定できず、したがって抗体のどの部分が固定化されたかを規定することができず、抗原認識部位にリンカーが導入された場合は、抗原捕捉能力が失われてしまう可能性があった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、固定化された抗体が抗原捕捉能力を維持できるような、抗体を固定化する方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは前記課題に鑑みて、鋭意検討を重ねた結果、本発明に到達した。即ち本発明は、抗体の抗原認識部位以外の部位を、特異的にかつ化学的に担体に結合させることを特徴とする、抗体の固定化方法である。以下、本発明をさらに詳細に説明する。

【0006】本発明では、抗体の抗原認識部位以外の部位を特異的にかつ化学的に担体に結合させる。抗体の抗原認識部位以外の部位としては特に限定はなく、例えばFc部分やヒンジ部など、抗体の抗原認識部位以外であればどこでもよい。抗体の抗原認識部位以外の部位を特異的にかつ化学的に担体に結合させる方法としては特に限定はないが、例えば抗体のヒンジ部のSH基を介して担体に結合させる、抗体の糖鎖を介して抗体を担体に結合させる、または抗体に導入された官能基を介して抗体を担体に結合させるなどの方法があげられる。

【0007】例えば抗体のヒンジ部のSH基を利用し、それを介して抗体を担体に固定化する場合を説明する。例えばインタクトのマウス抗体IgG1のヒンジ部において2本のH鎖がS-S結合しており、それを還元したときに生じるSH基を本発明では固定化に利用する。従ってこの時の抗体は、還元されてFab⁺またはFab^cなどにフラグメント化されたものである。通常の抗体の還元では、ヒンジ部のS-S結合のみ還元されてSH基が生じ、他の部位のS-S結合は還元されない。従ってヒンジ部のS-S結合から生じたSH基のみが固定化反応に用いられることとなり、この特定の部位を介して抗体の固定化が行われる。

【0008】抗体の還元を用いられる還元剤には特に限定はなく、通常用いられるものを使用することができる。例えば、メルカプトエタノール、メルカプトエチルアミン、ジチオスレイトールなどがあげられる。抗体の還元は、インタクトの抗体からでもF(ab⁺)₂フラグメントからでも行うことができる。

【0009】抗体の糖鎖を介して抗体を担体に結合させる場合は、例えばレクチン等を固定化させた担体に、抗体のFc部分に存在する糖鎖を結合させることにより、抗体を固定化することができる。これはレクチンが糖結合性蛋白質だからである。

【0010】抗体に導入させた官能基を介して抗体を担体に結合させる場合は、例えば抗体遺伝子又は抗体の抗

原認識部分を含む遺伝子に6個のヒスチジンをコードする遺伝子を導入し、大腸菌、酵母、株化細胞などで発現させる。一方、担体表面にNTA (N-(5-aminoo-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid) などを用いてニッケルを固定化し、この状態でヒスチジンを末端に発現させた抗体を加えると、ヒスチジン部分がニッケルに配位するため、特異的かつ一定方向に、担体表面に抗体が固定化されることになる (E. Hochuli, Journal of Chromatography, 1988, 444, 293 (1988))。

【0011】本発明において、抗体が固定化される担体には特に限定はなく、通常使用されるもので良い。例えばプラスチック、ガラス、架橋デキストラン、ニトロセルロース膜、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミドなどがあげられる。

【0012】本発明では、抗体を担体に直接結合させてもよい。しかしながら、抗体と担体との間にはリンカーを介在させることが好ましい。リンカーの一方の端は、抗体と結合するための結合基を持つか、または結合基を導入できるものである。結合基としては、特に限定はないが、抗体のヒンジ部のSH基を介する場合は、マレイミド基、ヒリジルジスルフィド基、ナフチルジスルフィド基、活性ハロゲン、チオフタルイミドなどがあげられる。リンカーの例としては、直鎖または分岐のアルキル基やビペラジニル基、4級アンモニウムなどの親水性基を含むもの、またオリゴエチレングリコールなどがある。

【0013】リンカーの他方の端は担体に結合させればよい。この場合、リンカーと担体とを直接結合させてもよいが、さらに他の物質を介して結合させてもよい。例えば担体とリンカーとの間にリガンド及びそれに対するレセプターを介在させ、それを介して抗体を担体に結合させてもよい。例えばリンカーの端にリガンド（またはレセプター）を結合させ、担体表面にはリガンドに対するレセプター（またはリガント）を結合させ、その両者を結合させることにより抗体の固定化を行うことができる。

【0014】リガンド及びレセプターとしては特に限定はないが、例えばアビジン-ビオチン、インシュリンとインシュリンレセプター、甲状腺刺激ホルモン (TSH) とTSHレセプターなどのホルモンとそのレセプター、ズブチリシンとズブチリシンインヒビター等のプロテアーゼとそのインヒビター、アンヒドロキモトリプシンとC末端アミノ酸としてトリプトファン、チロシン、フェニルアラニンを持つペプチド、アンヒドロトリプシンとC末端アミノ酸としてアルギニン、リジンを持つペプチドなどのプロテアーゼとその基質、相補的な配列を持つ2種類のDNAなどがあげられる。

【0015】またリガンド及びレセプターばかりでな

く、高分子物質を担体とリンカーとの間に介在させて抗体の固定化を行ってもよい。例えば、高分子物質をあらかじめ担体に結合させておき、そこにリンカーを結合させることもできる。高分子物質としては、例えばタンパク質があげられ、具体的にはウシ血清アルブミン、カゼインなどが使用できる。そのほかにも、糖鎖、ナイロンなどの合成高分子などがあげられる。

【0016】本発明の抗体の固定化法は、特にイムノアッセイ用抗体の固定化に好ましく用いられる。それは、短時間化が要求される診断分野の測定に用いられるためには、反応性がよい固定化抗体が必要だからである。

【0017】

【実施例】以下、本発明をさらに詳細に説明するために実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0018】実施例1

<抗体のF(ab')₂フラグメント化>抗TSH (甲状腺刺激ホルモン) モノクローナル抗体TSF972.3を0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、pHを3.7に合わせた後、ペプシン (SIGMA社製) を40U (ユニット) /mgタンパク質になるように加えた。約10μg分をゲルろ過クロマトグラフィー (東ソー社製、G3000SW_{XL}) にかけて、分子量の変化 (150,000から100,000) をモニターしながら、37℃でインキュベーションした。約90%の抗体がF(ab')₂フラグメント化したことを確認した後、3M Trisを加えて中和した。このサンプルに60%になるように飽和硫酸ナトリウムを加え、F(ab')₂フラグメントを沈殿させた後、12000rpm、20分遠心して沈殿を分離した。この沈殿を0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.0) に溶解した後、さらに同緩衝液で15時間透析した。

【0019】<F(ab')₂フラグメントのFab'化>600μLの0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0に溶解した抗TSHモノクローナル抗体TSF972.3 F(ab')₂ 10mgに0.1Mジチオスレイトール 150μLを加え、37℃、90分インキュベーションした。サンプルをゲルろ過クロマトグラフィー (東ソー社製、G3000SW_{XL}、溶離液は5mMEDTA含有0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0、) にかけて、Fab'画分を回収した (1.51mg/mL、5mL)。

【0020】<ビオチン-SH-Fab'の作製>抗TSHモノクローナル抗体TSF972.3 Fab' (1.51mg/mL) を3mL (4.53mg) に、ビオチン-リンカー-マレイミド基を有する Biotin-PEAC5-maleimide (同仁化学社製) 530μgを20μLのジメチルスルフォキシドに溶解して加え、25℃、16時間インキュベーションした。その後ゲルろ過クロマトグラフィー (東ソー社製、G3000SW_{XL}、溶離液は150mM硫酸ナトリウム含有

50mMリン酸緩衝液、pH6.6)にかけ、Biotin-PEAC5-maleimideが結合したFab⁺ (ビオチン-SH-Fab⁺とする)画分を回収し、未反応のBiotin-PEAC5-maleimideを除いた。

【0021】<アビジン-ビオチン固定化Fab⁺と直接固定F(ab⁺)₂-1との比較>96ウェルプレート(MAXISORP black、NUNC社製)にアビジン(和光純薬社製)を2μg/ウェル/100μL0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)の濃度で分注し、37℃、1時間インキュベーションした。0.05%Tween含有0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)でウェルを3回洗浄後、0.5%BSA含有Tris-HCl緩衝液(pH8.0)を分注して37℃、1時間インキュベーションし、ブロッキングした。洗浄後、前述のビオチン-SH-Fab⁺を0.5%BSA含有Tris-HCl緩衝液(pH8.0)に溶解し200ng/ウェル/100μL分注し、37℃、1時間インキュベーションした。結果として、107ng/ウェルの抗体が固定化された。これをアビジン-ビオチン固定化Fab⁺とする。

【0022】一方、抗TSHモノクローナル抗体TSF972.3F(ab⁺)₂を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)に溶解し、MAXISORP blackに200ng/ウェル/100μLの濃度で分注し、37℃、1時間インキュベーションした。ウェルを洗浄後、0.5%BSA含有Tris-HCl緩衝液(pH8.0)を分注して37℃、1時間インキュベーションし、ブロッキングした。結果として、137ng/ウェルの抗体が固定化された。これを直接固定F(ab⁺)₂-1とする。

【0023】以上のようにして得られた、Fab⁺のSH基をリンカー及びアビジン-ビオチンを介して固定化された抗体(アビジン-ビオチン固定化Fab⁺)と、物理吸着で直接ウェルに固定化された抗体(直接固定F(ab⁺)₂-1)とを用いてエンザイムイムノアッセイを行った。

【0024】モノクローナル抗体TSE031.1(モノクローナル抗体TSF972.3とはTSHの異なる部分を認識する)とアルカリフォスファターゼとのコンジュゲートを2μg/mLに希釈液(15%ウシ血清(日本生物材料社製)、1mMMgCl₂(和光純薬社製)、及び0.1mM ZnCl₂(和光純薬社製)含有50mM Tris-HCl緩衝液(和光純薬社製)、pH8.0)で希釈し、50μLずつ抗体を固定化したウェルに分注した。次にヒトTSH(スクリッパス社製)を希釈液で10μU(ユニット)/mLに希釈し、50μLずつウェルに分注した後、37℃でインキュベーションした。ヒトTSHを添加してから10分、30分、60分、90分、又は120分後にウェルを洗

浄後、LumiPhos530(和光純薬社製)100μL加え、室温で20分放置してから、LUMINOUS CT-9000D(ダイアヤトロン社製)にかけ、化学発光を測定した。

【0025】結果を図1に示す。図中、白丸はアビジン-ビオチン固定化Fab⁺を用いた場合、白四角は直接固定F(ab⁺)₂-1を用いた場合をそれぞれ示す。図から明らかなように、アビジン-ビオチン固定化Fab⁺の方が直接固定F(ab⁺)₂-1よりも固定化された抗体量は少ないにもかかわらず反応性は高かった。これは、直接固定F(ab⁺)₂-1は抗体の抗原認識部位が担体に固定化されている場合があるからである。一方、アビジン-ビオチン固定化Fab⁺は抗体の抗原認識部位以外の部位で特異的に担体に結合していると考えられる。

【0026】実施例2

<BSA-マレイミド固定化Fab⁺の作製>MAXISORP blackに0.5%BSA含有Tris-HCl緩衝液(pH8.0)を300μL/ウェル加え、37℃、1時間インキュベーションした。0.5%BSA含有Tris-HCl緩衝液(pH8.0)を捨てた後、0.1Mリン酸緩衝液に溶解した1mg/mLのsulfo-SMCC(ピアス社製;リンカー及びマレイミド基を有する)100μLをウェルに分注し、30℃、1時間インキュベーションした後、洗浄した。次いで実施例1で作製した抗TSHモノクローナル抗体TSF972.3Fab⁺を希釈列を作ってウェルに加えた。結果として、1ウェルあたり、7.1、4.9、2.8、1.6、又は1.0ngのFab⁺が固定化された。これをBSA-マレイミド固定化Fab⁺とする。

【0027】対照として、実施例1で作製した抗TSHモノクローナル抗体TSF972.3F(ab⁺)₂を0.1Mリン酸緩衝液、pH7.4に溶解し、希釈列を作って直接ウェルに添加した。0.5%BSA含有Tris-HCl緩衝液(pH8.0)でブロッキング後、結果として76.3、35.0、16.8、8.4、又は4.8ngのF(ab⁺)₂が固定化された。これを直接固定F(ab⁺)₂-2とする。

【0028】<BSA-マレイミド固定化Fab⁺と直接固定F(ab⁺)₂-2との比較>前項で作製した固定化抗体希釈列のウェルに、モノクローナル抗体TSE031.1とアルカリフォスファターゼとのコンジュゲートを2μg/mLとなるよう前述の希釈液で希釈し、50μLずつ分注した。次にヒトTSH(スクリッパス社製)を希釈液で10μU/mLに希釈し、50μLずつウェルに分注した後、37℃で40分間インキュベーションした。ウェルを洗浄後、LumiPhos530 100μL加え、室温で20分放置してから、LUMINOUS CT-9000Dにかけ、化学発光を

測定した。

【0029】結果を図2に示す。図中、黒四角はBSA-マレイミド固定化Fab⁺を用いた場合、黒三角は直接固定F(ab⁺)₂-2を用いた場合である。図から明かなように、同じ発光量を示すときの抗体量は、直接固定F(ab⁺)₂-2よりもBSA-マレイミド固定化Fab⁺の方が少なかった。例えば、50,000カウントを示すときの抗体量は、BSA-マレイミド固定化Fab⁺では2.8ngだが、直接固定F(ab⁺)₂-2では76ngであった。これは直接固定F(ab⁺)₂-2は抗体の抗原認識部位が担体に固定化されている場合があるからである。一方、BSA-マレイミド固定化Fab⁺は抗体の抗原認識部位以外の部位で特異的に担体に結合していると考えられる。

【0030】実施例3

<N-ヒドロキシサキシミド(NHS)を用いてビオチン標識したF(ab⁺)₂の作製>アミノ基及びリジン残基に結合するNHSを用いてビオチン標識を行った。即ち、実施例1で作製した抗TSHモノクローナル抗体TSF972.3F(ab⁺)₂3.1mg/mlの160μl(500μg)に、77mg/mlのBiotin-(AC5)₂-sulfo-OSu(同仁化学社製、ビオチン-リンカー-サキシミド基を有する)1μlを加え、4℃で16時間インキュベーションした後、ゲル透過クロマトグラフィー(東ソー社製、G3000SW_{XL}、溶離液は50mMリン酸緩衝液、150mM硫酸ナトリウム、pH6.6)にかけ、Biotin-(AC5)₂-sulfo-OSuが結合したF(ab⁺)₂(ビオチン-NHS-F(ab⁺)₂とする)画分を回収し、未反応のBiotin-(AC5)₂-sulfo-OSuを除いた。

【0031】<ビオチン-SH-Fab⁺とビオチン-NHS-F(ab⁺)₂と直接固定F(ab⁺)₂との比較>前述のビオチン-NHS-F(ab⁺)₂と実施例1で作製したビオチン-SH-Fab⁺は、ストレプトアビジンダイナビーズ(直径2.8μm、ダイナル社)に、それぞれアビジン-ビオチン結合を介して固定化された。また実施例1で作製したF(ab⁺)₂はトシル活性化ダイナビーズ(直径2.8μm、ダイナル社)に常法により物理吸着により直接固定化した。結果として50μgのダイナビーズにそれぞれ160~170ngの抗体が固定化された。

【0032】これら3種の固定化抗体を用いてエンザイムイムノアッセイを行った。即ち、0.5%BSAを含

むTris-HCl緩衝液(pH8.0)であらかじめブロッキングしたウエルに、各抗体固定化ビーズ50μgをいれた。前述のモノクローナル抗体TSE031.1とアルカリホスファターゼとのコンジュゲートを2μg/mlに前述の希釈液で希釈し、50μlずつウエルに分注した。次にヒトTSH(スクリップス社製)を希釈液で10μU/mlに希釈し、50μlずつウエルに分注した後、37℃でインキュベーションした。ヒトTSHを添加してから10分、30分、60分、120分後にビーズを洗浄後、LumiPhos530(和光純薬社製)100μlを加え、37℃で20分放置してから、LUMINOUS CT-9000D(ダイヤatron社製)にかけ、化学発光を測定した。

【0033】結果を図3に示す。図中、ダイヤはビオチン-NHS-F(ab⁺)₂を固定化した場合、四角はビオチン-SH-Fab⁺を固定化した場合、三角はF(ab⁺)₂を直接固定化した場合である。図より明かなように、F(ab⁺)₂を直接固定化した場合、及びビオチン-NHS-F(ab⁺)₂を固定化した場合よりも、ビオチン-SH-Fab⁺を固定化した方が反応性がよかった。これはF(ab⁺)₂を直接固定化した場合、及びビオチン-NHS-F(ab⁺)₂を固定化した場合は、抗体の抗原認識部位が担体に固定化されている場合があるからである。一方、ビオチン-SH-Fab⁺を固定化した場合は、抗体の抗原認識部位以外の部位で特異的に担体に結合していると考えられる。

【0034】

【発明の効果】本発明で提供される固定化方法によれば、抗体の抗原認識部位以外の部位を特異的かつ化学的に担体に結合させるため、抗体の抗原認識部位を担体やリンカーと結合させることがなく、抗体の抗原捕捉能力を維持したまま抗体を固定化することが可能である。特にリンカーを介して固定化させた場合は、担体表面からより離れた場所に抗体を固定できるので、担体による立体障害などの影響を受ける事なく抗体の抗原捕捉能力を発揮することができる。

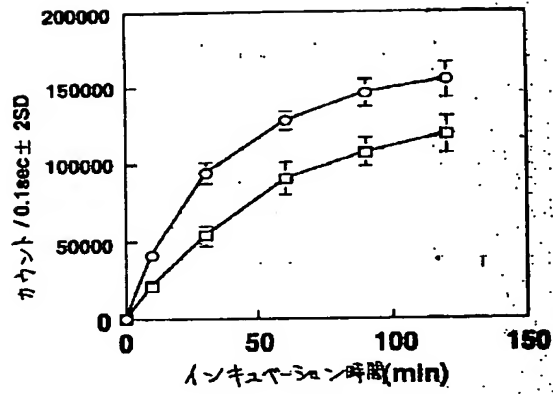
【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で測定した化学発光の値を示す図である。

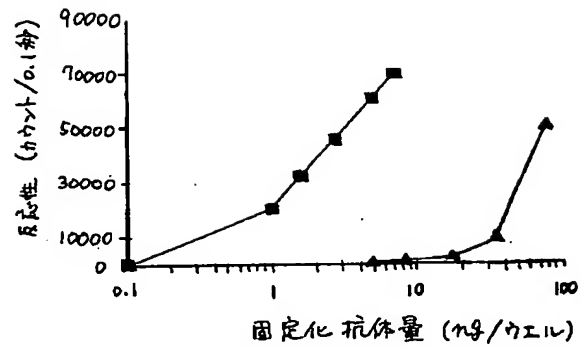
【図2】実施例2で測定した化学発光の値を示す図である。

【図3】実施例3で測定した化学発光の値を示す図である。

【図1】



【図2】



【図3】

